

AV

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-009380

(43)Date of publication of application : 18.01.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/155

A61K 31/155

(21)Application number : 05-038572

(71)Applicant : WASHINGTON UNIV

(22)Date of filing : 26.02.1993

(72)Inventor : WILLIAMSON JOSEPH R

CORBETT JOHN A

MCDANIEL MICHAEL L

TILTON RONALD G

(30)Priority

Priority number : 92 843387 Priority date : 28.02.1992 Priority country : US

## (54) INHIBITION OF NITROGEN MONOXIDE FORMATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To inhibit the nitrogen monoxide formation in warm-blooded mammals by administering hem with a specific amount of methylguanidine or dimethylguanidine.

CONSTITUTION: A warm-blooded mammal is orally administered with methylguanidine or dimethylguanidine at an effective amount enough to inhibit nitrogen monoxide formation therein (1mg/adult/d/kg b.w.) in the form of e.g. capsules or tablets, or parenterally administered therewith through intravenous or subcutaneous injection, thus inhibiting the nitrogen monoxide formation in the mammal without hampering the glucose-induced formation of the high-order glycation final product.

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] How to check generation of the nitrogen monoxide in a homeothermic mamal including medicating a homeothermic mamal with the methylguanidine or the dimethyl guanidine of a nitrogen-monoxide prevention effective dose.

[Claim 2] The method according to claim 1 by which the aforementioned mammalian is medicated with the aforementioned methylguanidine or dimethyl guanidine the inside of a vein, or hypodermically.

[Claim 3] The method according to claim 1 with which mammalian is medicated by the dose which checks generation of a nitrogen monoxide, without the aforementioned methylguanidine or dimethyl guanidine barring substantially the generation of a high order GURIKESHON end product by which glucose induction was carried out.

[Claim 4] The method according to claim 1 by which mammalian is medicated with the aforementioned methylguanidine.

[Claim 5] The method according to claim 1 by which mammalian is medicated with dimethyl guanidine.

---

[Translation done.]

---

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

#### [0001]

[Industrial Application] When this invention is told in detail to the method and pan which check generation of the nitrogen monoxide in a homeothermic mamal, it relates to medication of the methylguanidine as an inhibitor of generation of a nitrogen monoxide, or dimethyl guanidine.

#### [0002]

[Description of the Prior Art] A nitrogen-monoxide synthase carries out the catalyst of the functional oxidization with which L-citrulline and the nitrogen monoxide were mixed from L-arginine (NO., 1, 2). NO. It is thought that it functions as either a signal molecule or an effector molecule according to the isoform of an enzyme. The functional isoform of a nitrogen-monoxide synthase is little NO. which makes cGMP which activates a guanylate cyclase and, as a result, serves as inner-bark dependence relaxation (2) and a medium of neural transmission (3) generate. It generates. NO. It is generated in large quantities than the cytokine of a nitrogen-monoxide synthase, and the isoform in which endotoxin induction is possible, and functions as an effector molecule considered to become a medium of a cytotoxin operation of a macrophage on a target cell in a macrophage (4). NO. Since it is the powerful vasodilatation nervine and a blood style is made to increase, it is NO. Since both blood style and vessel permeability are made to increase, the vasoactive agent (it is (like a histamine and a bradykinin)) which stimulates generation is NO. It may become the candidate of the medium of the increase in the blood style induced by diabetes and the raised glucose and vessel permeability (5).

[0003] It was shown that interleukin 1 (IL-1) guides expression of the isoform in which cytokine induction of the nitrogen-monoxide synthase in the islet of Langerhans is possible in recent years. NO. It is proposed that generation may serve as an effector molecule which carries the prevention influence which IL-1 has on an islet-of-Langerhans function (6 7). Generation of the nitrogen monoxide by the islet of Langerhans is checked using generation of the iron-nitrosyl complex which is barred by the NG-monomethyl-L-arginine (NMMA), which was induced IL-1 and in which EPR detection is possible (8). Moreover, it is known that the cycloheximide which is a protein synthesis inhibitor will check generation of the nitrite induced IL-1, accumulation of cGMP, and generation of the iron-nitrosyl complex by the islet of Langerhans in which EPR detection is possible, therefore it is established that IL-1 guides the isoform in which cytokine induction of the nitrogen-monoxide synthase in the islet of Langerhans is possible.

[0004] The nosogeny of diabetic complications relates to non-enzyme-GURIKESHON of the component in the imbalance of the metabolism of a sorbitol, myo inositol and 1, and 2-diacyl-sn-glycerol, and a cell, and besides a cell. An aminoguanidine and a nucleophilic hydrazine compound bar generation of those GURIKESHON products, and the relation with this GURIKESHON is supported by proof of mitigating progress of some vessels (5 9) by which diabetes induction was carried out, a nerve (10), and collagen change (11). Baccarat is in vitro NO. by the albumin [ GURIKESHON / albumin ] recently / (12) /. It reports that quenching is mitigated by the aminoguanidine (it exists when albumin contacts a GURIKESHON agent), and a GURIKESHON product is NO. It proposed that inner-bark dependence relaxation might be

spoiled by mitigating activity.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] According to this invention, the new method of checking generation of a nitrogen monoxide in a homeothermic mamal is offered.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The method of this invention includes medicating a homeothermic mamal with the methylguanidine or the dimethyl guanidine of an effective dose, although it is little, and checking generation of a nitrogen monoxide. It is understood that mammalian can be medicated also with the salt which may be permitted pharmacologically, for example, HCl, and sulfate of these compounds. For now, the cause of a disease of diabetic complications does not yet clarify, and the medication with which it was shown that it can be prevented does not yet exist. Although it relates to the diabetic degree of serious illness remarkably since diabetic complications are influenced by blood sugar concentration and the hemoglobin [ GURIKETO / hemoglobin ], the effect of the attempt which prevents and/or reverses diabetic complications by efforts to make blood sugar concentration usual is not yet reported.

[0007] The method characterized by medicating a homeothermic mamal with the aminoguanidine of the amount which checks generation of a nitrogen monoxide, without raising artery blood pressure substantially is indicated by the U.S. application 07th under simultaneous continuation for which it applied on December 16, 1991 by these people / No. 807,912. According to this invention, when the usual rat was injected in a vein, when artery blood pressure increased, as it was proved, it was discovered that methylguanidine is a constitutive property and the powerful inhibitor of NO generation by which cytokine induction was carried out. However, in contrast with an aminoguanidine, methylguanidine is comparatively un-effective in checking the high order GURIKESHON product which is proved by growth of a fluorescence nature product characteristic of a high order GURIKESHON end product and by which glucose induction was carried out. Therefore, it is clear prevention's by the methylguanidine of the blood vessel malfunction induced by diabetes to attribute to the capacity which prevents NO product from generation of a high order GURIKESHON end product.

[0008] This specification will become clearer by the following explanation of the suitable example of this invention explained in relation to an attached drawing at the same time it ends by the claim which points out especially the theme considered to form this invention, and asserts a right clearly. Drawing 1 is a graph which shows change of the average artery blood pressure (MAP) induced by the injection in a bolus vein of methylguanidine (MG), an aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA), change of MAP is recorded by the rise of a pressure higher than the base line by %, and the amount of bolus injection medication is recorded by mumol/kg. Drawing 2 is recorded by % of the nitrite generation by which IL-1beta induction of the influence by Rin-m5F cell which is the graph which shows the influence of the methylguanidine (MG) given to the nitrite generation carried out, an aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA) IL-1beta induction, and it has on nitrite generation was done, and the concentration of an examination compound is recorded by muM. Drawing 3 is a graph which shows the influence of the methylguanidine (MG) given to the nitrite generation by Rin-m5F cell of which IL-1beta induction was done, dimethyl guanidine (DMG), and an aminoguanidine (AG) like drawing 2. Drawing 4 is a bar graph which shows the relative generation of a fluorescence nature product after incubating methylguanidine, an aminoguanidine, or a semicarbazide for six days in glucose-6-phosphate / lysine (G-6-P / lysine).

[0009] The influence of the methylguanidine given to the activity of a constitutive-property (blood vessel) nitrogen-monoxide synthase was evaluated by supervising change of the average artery blood pressure (MAP) after the injection in a vein of the methylguanidine in the usual rat of an anesthesia state. Methylguanidine, an aminoguanidine, and a dosage operation of NMMA are shown in drawing 1. Since methylguanidine had L-arginine and the antagonism inhibitor of a nitrogen-monoxide synthase, i.e., structure similarity powerful to NMMA, these

compounds investigated the influence of the methylguanidine given to two generation, the nitrite have the equal GUANIDINO nitrogen machine chemically and according to Rin-m5F cell, and cGMP, of which IL-1 $\beta$  induction is done, and compared it with the effect of NMMA in the same examination ( drawing 2 ). Moreover, in the analogous examination, methylguanidine and its proximity prototype dimethyl guanidine were compared with the influence of an aminoguanidine (AG), respectively ( drawing 3 ). Rin-m5F cell lineage is an islet-of-Langerhans cell adenoma cell lineage of the rodent beta cell it is indicated to be that the isoform in which cytokinin induction of a nitrogen-monoxide synthase is possible is included. Drawing 2 and 3 show a dosage operation of the methylguanidine in the product by which IL-1 $\beta$  induction of the nitrite (oxidization product of a nitrogen monoxide) by Rin-m5F cell which incubated for 18 hours with the methylguanidine of the concentration five units / ml was IL-1 $\beta$ \*\* Indicated to be, dimethyl guanidine, an aminoguanidine and NMMA, or AG was done, dimethyl guanidine, an aminoguanidine and NMMA, or AG. The influence of the methylguanidine given to GURIKESHON was evaluated by measuring growth of the fluorescence nature product after the incubation in glucose-6-phosphate / lysine, and compared with the effect that an aminoguanidine and a semicarbazide correspond. Although a result is shown in drawing 4 , methylguanidine shows what is comparatively been inactive (comparing with an aminoguanidine and a semicarbazide) in the prevention of a GURIKESHON product by which glucose induction is carried out so that it may be proved by growth of a fluorescence nature product characteristic of the end product of GURIKESHON.

[0010]

[Example] Although the following detailed examples are indicated in order to explain this invention further, please understand that this invention is not what is limited by the detailed portion indicated in these specific examples or this specification. The result obtained in these examples is shown in Tables 1-5 and the attached drawing 1-4. This example explains how to prevent the blood vessel malfunction induced by diabetes using methylguanidine, and check a nitrogen-monoxide synthase.

[0011] material and a method animal experiment — all the rats used in the examination of these were shut up indoors, and it bred according to the "university committee about protection breeding of a laboratory animal", and the "guideline of NIH about laboratory animal welfare" The rat was put in indoors separately, gave food (feed for standard rats; RARUSUTOMPYURINA of U.S. Indiana state Richmond), and water without any restriction, and gave the light of 12-hour Ming / dark period. : which divided into four groups the Sprague-Dawley rat of the male which was 225-250g weight first — the diabetes in which diabetes; and the group 4 with the unsettled contrast; group 3 in which the contrast; group 2 with an unsettled group 1 carried out methylguanidine (mg) processing carried out mg processing Diabetes was induced by injecting with a streptozotocin (sigma chemical company make of U.S. Missouri St.Louis) in 45mg / weight vein of 1kg using a ketamine anesthetic. The methylguanidine hydrochloride (sigma chemical company make) was administered hypodermically once per day in the amount of medication with a weight [ 25mg / weight ] of 1kg. Furthermore, while giving the water containing the methylguanidine of 1 g/L to the diabetic rat, the water containing the methylguanidine of 2.5 g/L was given to the rat of contrast. The consumption of water was supervised about all rats weekly. Weight was measured weekly, was evaluated three days after streptozotocin medication of the plasma glucose concentration of the morning non-abstaining from food (checking diabetic induction), and, subsequently was evaluated every two weeks after that using the common use glucose oxidase method (14) of a tanker and PASONO. After four weeks, all the rats were put into the metabolism cage of 24 hour each, and food consumption (g / weight of 100g / 24 hours) and the urine discharge (ml / kidney / 24 hour) were measured. Urinary feed was saved at -70 degrees C for measurement of a urine albumin discharge (refer to following). After [ of diabetes induction ] five weeks, consideration of the following permeability and a blood flow was performed using the rat.

[0012] About test-method part blood vessel albumin osmosis, they are two different iodine isotopes. <sup>131</sup>I Reach. The fixed quantity was carried out using the isotope dilution technology

based on the injection medication of bovine serum albumin (BSA) which carried out the indicator by  $^{125}\text{I}$  (15–17). It is the marker with which the fixed quantity of the blood vessel albumin filtration is carried out after [ of marker circulation ] 10 minutes using  $^{125}\text{I}$ -BSA, and  $^{131}\text{I}$ -BSA is contained in a blood vessel on the other hand. It acted as a plasma capacity marker for amendment of  $^{125}\text{I}$ -BSA organization activity.

[0013] the iodine isotope method (15) given [ the monomer BSA (20mg) by which manufacture refining of the marker by which the radiation indicator was carried out was carried out ] in the above  $^{131}\text{I}$  — or — It iodized by  $^{125}\text{I}$ (product made from NEN RESACHI products of U.S. Massachusetts state Boston)1mCi.  $^{57}\text{Co}$ -EDTA was prepared as mentioned above (15 16), the  $^{46}\text{Sc}$ -microsphere (diameter of 10 micrometer) was used, and the following method estimated the part blood style.

[0014] The surgical method rat was anesthetized by INAKUCHIN (FRG, Constance, motorbike gal DIN) (–100mg /, medication in weight the peritoneum of 1kg), \*\*\*\*, the 37-degree C tray for surgery, and the rectal-temperature probe were used, and a main temperature was maintained at  $37 \pm 0.5$  degrees C. The polyethylene pipe (0.58mm bore) with which the left thigh vein, the left iliac artery, the right clavicle artery, and the right carotid artery were filled up with the brine (a 400U heparin / ml) which carried out heparin processing was inserted. Injection medication of the marker was carried out using thigh vein cannula, and right clavicle artery cannula was connected to the pressure transducer for the surveillance of blood pressure. The left iliac artery was connected to the 1ml syringe attached in the harbor DOMODERU 940 fixed-speed drainage pump formed beforehand in order to discharge by 0.055ml constant speed for /. The nose of cam of the cannula in a right carotid artery was placed into the left ventricle of the heart, and was used for pouring of a microsphere by which the radiation indicator was carried out. Intubation was carried out to the trachea and it connected with the artificial respiration equipment for small rodents which helps continuous aeration.

[0015] it sets at the test-method time 0 — it injected with  $^{125}\text{I}$ -albumin (inside of 0.3ml of brine), and  $^{57}\text{Co}$ -EDTA (– in 0.1ml of brine 0.1microcurie) in the vein, and the drainage pump was simultaneously put into operation After [ of time 0 ] 8 minutes, it injected with  $^{131}\text{I}$ -BSA 0.2ml, and it injected slowly after 1 minute, having  $^{46}\text{Sc}$ -applied it for – 30 seconds. After 10 minutes, the whole-blood liquid flow of the heart was stopped, the drainage pump was suspended simultaneously, and various organizations were extracted for gamma ray spectrometry. The kidney, the bladder, and the ureter were taken out. It was cut open by the method which explained the eye above (15 16), and the organization obtained from both eyes was assembled before gamma ray spectrometry. The weight of all organization samples and artery plasma samples was measured, it measured with the gamma ray spectrometry vessel connected with the Hewlett Packard 1000A computer with an interface, data were amended by the aforementioned computer to the background, and it was saved for the next analysis.

[0016] It computed by the method (15, 16, 17) which already explained the quantitative index of the analysis  $^{125}\text{I}$ -BSA organization cleaning value of data, and expressed as a part for mug plasma / g organization weight/. It organizes [ inner / be / it ] very simply. Inside of the artery plasma sample obtained by  $^{125}\text{I}$ -BSA activity at the time of a test end By applying the ratio of  $^{125}\text{I}$ -BSA /  $^{131}\text{I}$ -BSA activity,  $^{125}\text{I}$ -BSA organization activity was amended about the marker contained during an organization. Blood vessel – It was amended.  $^{125}\text{I}$ -BSA organization activity was time-average-ized. It divided by  $^{125}\text{I}$ -BSA plasma activity (obtained from the sample with which the plasma obtained from the discharge syringe was fully mixed), and the marker cycle time (for 10 minutes), and, subsequently to per organization weight of 1g, standardized. The filtration velocity (GFR) of a kidney glomerulus was computed by the already explained method (18). In order to compute a part blood style, it broke by the total activity of  $^{46}\text{Sc}$  in the reference blood sample which was able to obtain the total activity of  $^{46}\text{Sc}$  in a retina from the discharge syringe, and subsequently, it applied at pump discharge speed and expressed as a part for ml/g organization weight/(19).

[0017] The high order glycosylation product of the manufacture lysine-origin of a high order glycosylation end product was prepared by the method (12) of baccarat by incubating the

glucose-6-phosphate and L-lysine of 100mM the 0.2M sodium phosphate buffer solution and in pH 7.4. This incubation was performed by having maintained the sterilization state, and it was maintained for – six days in the room temperature in the dark place, and the LS-5B fluorophotometer of PerkinElmer was then used, the excitation in 370nm and the radiation in 440nm were used for it, and the degree of relative fluorescence was measured as an index of GURIKESHON. a spectrum — before the photometry, the sample was diluted with brine 1:11 The capacity for the methylguanidine of 10 and 100mM concentration, an aminoguanidine, or a semicarbazide to check a GURIKESHON process was measured in two separate examinations ( drawing 4 ).

[0018] The blood-pressure-measurement taele-cuff method (20 21) was used, the interval of one week was set and the blood pressure of the contraction stage in a conscious rat was measured. First, the animal was placed into the arresting gear and the method by expanding a sphygmomanometer several times was adopted. Blood pressure was measured also from the iliac artery cannula in the rat of an anesthesia state between considerations of permeability.

[0019] The Sprague-Dawley rat of the usual male of 300g weight from the influence 250 of pill injection of the methylguanidine given to average artery blood pressure Subsequently it anesthetizes by d-tubocurarine chloride with a weight [ 0.1ml / weight ] of 1kg. INAKUCHIN with a weight [ 100mg / weight ] of 1kg — The polyvinyl pipe (0.8x0.5mm) which filled up the left thigh blood vessel (marker pouring sake) and the right iliac artery (the surveillance of blood pressure sake) with the brine by which heparin processing was carried out was inserted, and cannula was inserted in the trachea, and in order to help continuous aeration, it connected with the artificial respiration equipment for small rodents. After artery blood pressure was stabilized, in the separate animal, it injected with the increasing methylguanidine of an amount (3.1 and 50micro mol [ /kg ] weight) or the NG-monomethyl-L-arginine (NMMA) in the vein by the capacity of 0.5ml, and the elevation of blood pressure of a peak was recorded using RS3200 recording device of gold. The result was expressed as a percentage of the elevation of blood pressure on the base line.

[0020] Statistical-analysis data were expressed as average\*\*1SD. Analysis of distribution was performed using the general linear-model procedure of SAS. In order to decrease the error potential type 1 relevant to multiplex comparison, the BANDERU bell DIN test estimated beforehand the difference between [ whole ] the groups to each parameter. When a remarkable difference ( $p < 0.05$ ) was statistically accepted between the groups to the given parameter, the double method was compared with the least square method after non-population parameter (order of rank) BURON conversion of all data.

[0021] Example 2 this example is IL-1beta by Rin-m5F cell. – The influence of methylguanidine in the induced nitrite generation is explained ( drawing 2 ). Rin-m5F cell which came to hand from the University of Washington tissue culture support pin center, large was taken out from the growth flask (55 – 80x10<sup>6</sup> cell / flask) by the trypsin/EDTA treatment, and was divided equally and put in into the 1ml Petri dish (per [ condition ] 1 – 2x10<sup>6</sup> Rin-m5F cell). Incubation of the cell was carried out for 18 hours into 1ml of completeness CMRL-1066 to which a perfect CMRL-1066 tissue-culture machine (the fetal calf serum and 2mML- glutamine by which heat inactivation was carried out 10%, 50 units / ml penicillin, and 50microg [ /ml ] streptomycin) or methylguanidine (MG), an aminoguanidine (AG), or NMMA was supplied (under 95% air, and 5% atmosphere of CO<sub>2</sub>). The supernatant liquid was removed after incubation and it measured in 100microl aliquot by the same common use method as the method (8 13) which described the nitrite above. It is the average [ of 4 which expresses as induced nitrite generation (%) and contains 3 times per examination of repeats ] of each examination of \*\*SEM IL-1 about a result. prevention of the nitrogen-monoxide generation by the isoform which a result can cytokine induce [ of a nitrogen-monoxide synthase ] — setting — both AG and NMMA — MG – the 10 times larger thing is shown

[0022] IL-1beta by example 3 Rin-m5F cell – It examines by the method given [ each influence of methylguanidine / which is given to generation of the induced nitrite /, 1, and 1-dimethyl guanidine, and an aminoguanidine ] in an example 2, and the obtained result is shown in drawing 3 . The result shows the large thing in order of AG>DMG>MG about prevention of

the cytokine induction isoform of a nitrite synthase.

[0023] The following tables 1-5 and the attached drawings 1-4 record the result obtained in the above-mentioned example. These results show that methylguanidine and dimethyl guanidine are a constitutive property and the powerful inhibitor of NO generation by which cytokine induction was carried out. This is IL-1beta of the nitrite in the cell adenoma cell of the rodent according to methylguanidine and dimethyl guanidine as shown in elevation of the average arterial blood pressure by the methylguanidine at the time of carrying out the phleboclysis to the usual rat as shown in drawing 1, drawing 2, and 3. - It is proved by prevention of the induced increase. In methylguanidine barring the GURIKESHON generation by which glucose induction was carried out (proved by generation of a fluorescence nature product characteristic of a high order GURIKESHON end product), since it is inactive comparatively ( drawing 4 ) (comparing with an aminoguanidine), it is thought that the prevention by the methylguanidine of the vessel malfunction of diabetes induction is what is attributed to the capacity for it to check NO generation. Therefore, the dimethyl guanidine which is methylguanidine and its contiguity prototype is effective in prevention of the complication of diabetes besides the inflammation nature accompanied by the increase in generation of NO, and an immune disorder.

[Table 1]

表 1

体重、血漿グルコース及び水消費に与える  
糖尿病及びメチルグアニジンの影響

|                    | 対 照    | 対 照    | 糖尿病     | 糖尿病    |
|--------------------|--------|--------|---------|--------|
|                    | 対 照    | +mg    | 糖尿病     | +mg    |
| ラット数               | 10     | 11     | 14      | 18     |
| 体 重 (g)            |        |        |         |        |
| 初 期                | 249±20 | 256±16 | 250±19  | 248±18 |
| 2週間後               | 326±25 | 300±31 | 297±23  | 271±23 |
| 4週間後               | 375±41 | 351±37 | 334±45  | 294±50 |
| 血漿グルコース<br>(mg/dL) | 130±15 | 131±28 | 419±120 | 420±87 |
| ヘマトクリット(%)         | 43±2   | 42±1   | 42±1    | 42±2   |
| 血 圧 (mm Hg)        |        |        |         |        |
| 意識あり               | 125±18 | 121±7  | 123±5   | 126±5  |
| 麻酔状態               | 118±14 | 114±14 | 120±16  | 121±14 |
| 水消費 (ml/日)         | 46±6   | 32±9   | 108±42  | 93±53  |

[Table 2]



表 2

<sup>125</sup>I-アルブミン浸透<sup>a</sup> に与える糖尿病  
及びメチルゲアニジン(mg)の影響

|        | 対 照                 | 対 照<br>+mg | 糖尿病<br>+mg            | 糖尿病<br>+mg          |
|--------|---------------------|------------|-----------------------|---------------------|
| ラット数   | 10                  | 8          | 11                    | 9                   |
| 目      |                     |            |                       |                     |
| 前部ブドウ膜 | 266±77 <sup>b</sup> | 359±146    | 623±109 <sup>a</sup>  | 370±60 <sup>b</sup> |
| 後部ブドウ膜 | 328±106             | 312±101    | 742±134 <sup>a</sup>  | 358±108             |
| 網膜     | 47±12               | 61±11      | 116±30 <sup>a</sup>   | 55±18               |
| 座骨神経   | 47±13               | 47±10      | 121±22 <sup>a</sup>   | 50±10               |
| 大動脈    | 62±20               | 60±18      | 155±37 <sup>a</sup>   | 85±41               |
| 腎 臓    | 727±239             | 714±214    | 1011±265 <sup>c</sup> | 738±169             |
| 肺      | 1805±532            | 1656±454   | 1405±324              | 1498±487            |
| 横隔膜    | 201±75              | 190±27     | 210±61                | 216±46              |
| 心 臓    | 521±135             | 731±269    | 534±62                | 599±68              |
| 脳      | 5±3                 | 4±3        | 5±2                   | 6±4                 |

<sup>a</sup>  $\mu$ g 血漿/体重 1 g/分; 試験手順の詳細は実施例 1 の方法を参照せよ。

<sup>b</sup> 平均±SD

スチューデントの t 検定により未処理の対照とは著しく異なる。

: <sup>a</sup>p<0.001; <sup>b</sup>p<0.05; <sup>c</sup>p<0.01.

[Table 3]

表 3

部位血液流へ与える糖尿病及びメチルゲアニジン(mg)の影響

|         | 前部ブドウ<br>(n) 膜 | 後部ブドウ<br>膜 | 網 膜       | 座骨神経      | 腎 臓     |
|---------|----------------|------------|-----------|-----------|---------|
| 対照 (10) | 2.0±0.6        | 3.4±0.6    | 0.43±0.02 | 0.06±0.02 | 6.5±0.3 |

|           |                      |                      |                        |                        |                      |
|-----------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| 対照+mg (8) | 2.4±0.5              | 3.3±0.6              | 0.45±0.07              | 0.07±0.03              | 4.8±0.3 <sup>a</sup> |
| 糖尿病 (10)  | 2.7±0.3 <sup>b</sup> | 4.2±0.5 <sup>b</sup> | 0.57±0.08 <sup>a</sup> | 0.09±0.01 <sup>a</sup> | 6.0±0.4 <sup>c</sup> |
| 糖尿病+mg(9) | 2.3±0.6              | 3.9±0.6              | 0.45±0.04              | 0.06±0.02              | 5.8±0.3 <sup>a</sup> |

\* ml/分/体重1g; 値は放射線標識されたミクロスフェアを使用して測定した平均±1SDである。(～10μm 径)

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: \*p<0.001;

<sup>b</sup>p<0.005; <sup>c</sup>p<0.01.

[Table 4]

表 4

GFR\* へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

|        | (n)  | 全腎臓当り                       | 腎臓1g 当り     |
|--------|------|-----------------------------|-------------|
| 対照     | (10) | 1.33 ± 0.19                 | 0.85 ± 0.07 |
| 対照+mg  | (8)  | 1.53 ± 0.29                 | 0.87 ± 0.08 |
| 糖尿病    | (10) | 1.81 ± 0.25 <sup>a</sup>    | 0.92 ± 0.14 |
| 糖尿病+mg | (9)  | 1.59 ± 0.15 <sup>b, c</sup> | 0.85 ± 0.09 |

\* ml/分; 値は放射線標識された<sup>57</sup>Co-EDTAを使用して測定した平均±1SDである。

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: \*p<0.001;

<sup>b</sup>p<0.005

スチューデントのt検定により糖尿病と著しく異なる。: \*p<0.05.

[Table 5]

表 5

組織ソルビトールとミオイノシトールへ与える  
糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

|  | 対 照     | 糖尿病     |
|--|---------|---------|
|  | 対 照 +mg | 糖尿病 +mg |

| ラット数     | 7        | 8         | 11       | 9        |
|----------|----------|-----------|----------|----------|
| 網 膜      |          |           |          |          |
| ソルビトール   | 102±16*  | 102±31    | 933±275  | 533±265  |
| ミオイノシトール | 1613±516 | 1529±187  | 1564±452 | 1513±402 |
| 座骨神経     |          |           |          |          |
| ソルビトール   | 183±41   | 194±75    | 1999±334 | 1234±710 |
| ミオイノシトール | 3943±526 | 4263±1587 | 3444±639 | 3308±792 |
| 赤血球      |          |           |          |          |
| ソルビトール   | 6±1      | 6±2       | 44±9     | 40±8     |
| ミオイノシトール | 131±47   | 104±19    | 109±20   | 103±19   |

\* 値は平均±SDである。；試験手順については実施例1の方法を参照せよ。

[0024] The methylguanidine and the dimethyl guanidine inhibitor of nitrogen-monoxide generation which were explained into this specification can be used so that a homeothermic mamal may be medicated as a prescription object with the method of common use, the diluent which may be permitted pharmacologically preferably, and support. The amount of the activity inhibitor prescribed for the patient must be an effective dose, i.e., the amount which does not show a toxic effect heavier than the profits accompanying the use although it is effective in medicine. It is thought that the amount of medication per human being's adult's day is usually the range of about 1mg or more of chemicals per weight of 1K. Although the suitable path of medication is the internal use by a capsule, the tablet, syrup, the electricity sill, and its analogous form, parenteral administration like the inside of a vein and the peritoneum or hypodermically can also be used for it. It can raise administering this medicine intravenously as a water solution like a physiological saline as an example. The suitable prescription object of this medicine in the diluent in a medical treatment medication form object which may be permitted pharmacologically, and support can refer to the common text in the ASAOSORU edit "REMINTONZUFAMASHU Tikal science" 16 edition of the MAKKU publishing company of for example, U.S. Pennsylvania Easton, and this technical field as shown in (1980), and can prepare it.

[0025] For this contractor, the example of various others which do not deviate from the soul and the range of this invention will become clear, after reading this specification. Such all examples mean being included within the limits of the claim in this specification.

[0026] The bibliography quoted in the parenthesis in this specification is as follows.

1. 88 D.J. SUCHU yell, H.J. CHO, N.S. won, M.F. UAISU, C.F. NAZAN, "Proc.Natl.Acad.Sci.USA", 7773 (1991).
2. S. MONKADA, R.M.J. PARUMA, E.A. HIGUSU, "Pharmacol.Reviews", 43,109 (1991).
3. J. girth wait, "Trends Neurol.Sci.", 14:60 (1991).
4. J.B. HIBUSU and Jr. — "Nitric Oxide fromL-Arginine:a Bioregulatory System", S. MONKADA and E. HIGUSU, an Eds. ERUZEBI yell, New York, (1990), and pp 189-223.
5. 7 G. PAGURIZE, R.G. chill ton, J.R. Williamson, "Diabetes/Metabolism Reviews", 35 (1991).
6. C. Southern, D. SHARU star, I.C. green, "Febs Lett.276", 42 (1990).
7. J.A. corvette, J.L. won, M.A. SUWITO land, J.R. Lancaster, Jr., and M.L. MAKUDANIERU, "Biochemical J." (submitted).
8. J. J.A. corvette, J.R. Lancaster, Jr., and M.A. SUWITO land, M.L. MAKUDANIERU, "Biol.Chem.", 266, 21351-21354 (1991).
9. 16 J.R. Williamson et al., "Diabete & Metab.", 3369 (1990). T. 40 A SORISU-reaper rotor, M. Cooper, D. PAPAZO glow, B. Clark, G. JIERAMUSU, "Diabetes", 1328 (1991).

10. M. KIHARA et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA88 , 6107 (1991).
  11. 318 N. M. Brown Lee, A. Cerami, H. BURASSARA, "Engl.J.Med.", 1315 (1988). M. 232
  - Brown Lee, H. BURASSARA, A. KUNI, P. URURIHHI, A. Cerami, "Science", 1629 (1986).
  12. J. R. BUKARA, KJ. Tracy, A. Cerami, "Clin.Invest.", 87,432 (1991).
  13. L.C. greens, "Anal.Biochem.126", 131 (1982).
  14. An O.H. tanker, J.V. PASONO (1972) "A Flexible System of Enzymatic Analysis.",  
Orlando : Academic Press.
  15. Game R.G. chill ton and K., G. PAGURIZE, D.M. IDO, M.A. pro BINSU, W.R. Sherman, C. kilo,  
J.R. Williamson, "Diabetes 38", 1258-1270 (1989).
  16. Game G. PAGURIZE, R.G. chill ton, A. speediness, and K., M.A. pro BINSU, C. kilo, J.R.  
Williamson, "Metabolism 39", 690-697 (1990).
  17. Game G. PAGURIZE, R.G. chill ton, and K., A. speediness, M. pro BINSU, D.M. IDO, P.E.  
REISHI, C. kilo, J.R. Williamson, "Diabetes 39", 323-332 (1990).
  18. Y.Ido, an R.G. chill ton, game K. and J.R. Williamson, "Kidney Int.", In press, 1992.
  19. G. PAGURIZE, an R.G. chill ton, A. speediness, E. SANTARERI, D.M. IDO, M.A. pro BINSU,  
C. kilo, W.R. Sherman, J.R. Williamson, "Diabetes 39", 312-322 (1990).
  20. J. M.J. deflection glee, "Lab.Clin.Med.", 62,223-230 (1963).
  21. J. J.M. FEFA, M.A. FEFA, E.D. flow RIHHI, "Lab.Clin Med.", 78,957-962 (1971).
- [0027] Research of \*\*\*\*\* to assistance of the government was done in part by the license  
DK 06181 of the U.S. National Institute of Health, T32DK07296, and EY06600, HL39934 and  
DK20579 gaining assistance.

---

[Translation done.]



\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the graph which shows change of the average arterial blood pressure (MAP) induced by the bolus phlebotomy of methylguanidine (MG), an aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA).

[Drawing 2] It is the graph which shows the influence of the methylguanidine (MG) given to the nitrite generation by Rin-m5F cell of which IL-1beta induction was done, an aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA).

[Drawing 3] It is the graph which shows the influence of the methylguanidine (MG) given to the nitrite generation by Rin-m5F cell of which IL-1beta induction was done, dimethyl guanidine (DMG), and an aminoguanidine (AG) like drawing 2.

[Drawing 4] It is the bar graph which shows the relative generation of a fluorescence nature product after incubating methylguanidine, an aminoguanidine, or a semicarbazide for six days in glucose-6-phosphate / lysine (G-6-P / lysine).

---

[Translation done.]

---

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## CORRECTION or AMENDMENT

[Official Gazette Type] Printing of amendment by the convention of 2 of Article 17 of patent law.

[Section partition] The 2nd partition of the 3rd section.

[Date of issue] November 21, Heisei 12 (2000. 11.21)

[Publication No.] JP,6-9380,A.

[Date of Publication] January 18, Heisei 6 (1994. 1.18)

[\*\*\*\* format] Open patent official report 6-94.

[Filing Number] Japanese Patent Application No. 5-38572.

[The 7th edition of International Patent Classification]

A61K 31/155 AED  
ADP

[F]

A61K 31/155 AED  
ADP

[Procedure revision]

[Filing Date] January 12, Heisei 12 (2000. 1.12)

[Procedure amendment 1]

[Document to be Amended] Specification.

[Item(s) to be Amended] Claim.

[Method of Amendment] Change.

[Proposed Amendment]

[Claim(s)]

[Claim 1] How to check generation of the nitrogen monoxide in this homeothermic mammal including medicating a homeothermic mammal (except for human being) with the methylguanidine or the dimethyl guanidine of a nitrogen-monoxide prevention effective dose.

[Claim 2] The method according to claim 1 by which the aforementioned mammalian is medicated with the aforementioned methylguanidine or dimethyl guanidine the inside of a vein, or hypodermically.

[Claim 3] The method according to claim 1 with which the aforementioned mammalian is medicated with the amount of medication which checks generation of a nitrogen monoxide, without the aforementioned methylguanidine or dimethyl guanidine barring substantially the generation of a high order GURIKESHON end product by which glucose induction was carried out.

[Claim 4] The method according to claim 1 by which the aforementioned mammalian is medicated with the aforementioned methylguanidine.

[Claim 5] The method according to claim 1 by which the aforementioned mammalian is medicated with the aforementioned dimethyl guanidine.

[Claim 6] The nitrogen-monoxide generation inhibitor which contains methylguanidine or dimethyl guanidine as an active principle.

[Translation done.]

(19)日本特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-9380

(43)公開日 平成6年(1994)1月18日

| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|---------|-----|--------|
| A 6 1 K 31/155           | A E D | 8413-4C |     |        |
|                          | A D P | 8413-4C |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数5(全 13 頁)

|             |                 |         |   |
|-------------|-----------------|---------|---|
| (21)出願番号    | 特願平5-38572      | (71)出願人 | 591003183<br>ワシントン ユニバーシティー<br>アメリカ合衆国ミズーリ州。セント ルイス、ブルッキングス ドライブ ナンバー 1                         |
| (22)出願日     | 平成5年(1993)2月26日 | (72)発明者 | ジョセフ アール。ウィリアムソン<br>アメリカ合衆国ミズーリ州セント ルイス、エス。ユークリッド 660, ワシントン ユニバーシティ スクール オブ メド。デプト オブ パソロジィ 気付 |
| (31)優先権主張番号 | 8 4 3 3 8 7     | (74)代理人 | 弁理士 浅村 皓 (外3名)  |
| (32)優先日     | 1992年2月28日      |         |   |
| (33)優先権主張国  | 米国 (U S)        |         |   |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 一酸化窒素生成の阻害方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 温血哺乳動物における一酸化窒素生成を阻害する方法を提供する。

【構成】 一酸化窒素阻害有効量のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物に投与する。



(2)

特開平6-9380

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一酸化窒素阻害効果のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物に投与することを含む温血哺乳動物における一酸化窒素の生成を阻害する方法。

【請求項2】 前記メチルグアニジンまたはジメチルグアニジンが、前記哺乳動物へ静脈内または皮下に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記メチルグアニジンまたはジメチルグアニジンが、グルコース誘発された、高次グリケーション最終生成物の生成を実質的に妨げることなく一酸化窒素の生成を阻害する投与量により哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記メチルグアニジンが哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項5】 ジメチルグアニジンが哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、温血哺乳動物における一酸化窒素の生成を阻害する方法、さらに詳しく言うと、一酸化窒素の生成のインヒビターとしてのメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンの投与に関する。

【0002】

【従来の技術】一酸化窒素シンターゼは、L-アルギニンからL-シトルリン及び一酸化窒素の混合された機能酸化を触媒する(NO、1、2)。NOは、酵素のイソフォームに応じてシグナル分子またはエフェクター分子のいずれかとして機能すると考えられる。一酸化窒素シンターゼの機能的イソフォームは、グアニル酸シクラーゼを活性化しその結果内皮依存弛緩(2)及び神経伝達(3)の媒介となるcGMPを生成させる少量のNO<sup>+</sup>を生成する。NOは、一酸化窒素シンターゼのサイトカイン及び内毒素誘発可能なイソフォームより大量に生成され、大食細胞中では、標的細胞上で大食細胞の細胞毒作用の媒介となると考えられるエフェクター分子として機能する(4)。NOは、強力な血管弛緩神経薬であり、血液流を増加させるので、そして、NO生成を刺激する血管作用薬(ヒスタミン及びブラジキニンのような)は、血液流及び血管透過性の両者を増加させるので、NO<sup>+</sup>は糖尿病及び高められたグルコースにより誘発される血液流及び血管透過性の増加の媒体の候補者となり得る(5)。

【0003】近年、インターロイキン-1(IL-1)が、ランゲルハンス島中の一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームの表現を誘導することが示された。NOの生成は、IL-1がランゲルハンス島機能に与える阻害影響を媒介するエフェクター分子となり得ることが提案されている(6、7)。N<sup>ε</sup>-モノメチル-L-アルギニン(NMMA)により妨げられ

2

るIL-1誘発されたEPR検出可能な鉄-ニトロシル複合体の生成を利用して、ランゲルハンス島による一酸化窒素の生成が確認されている(8)。また、タンパク質合成インヒビターであるシンクロヘキシミドは、IL-1誘発される亜硝酸塩の生成、cGMPの蓄積及びランゲルハンス島によるEPR検出可能な鉄-ニトロシル複合体の生成を阻害することが知られており、従って、IL-1は、ランゲルハンス島内の一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームを誘導することが確立されている。

【0004】糖尿病合併症の病因は、ソルビトール、ミオイノシトール及び1、2-ジアシル-sn-グリセロールの代謝の不均衡及び細胞内及び細胞外の成分の非酵素的グリケーションに関連する。このグリケーションとの関連は、アミノグアニジン、求核性ヒドラジン化合物がそれらのグリケーション生成物の生成を妨げ、いくつかの糖尿病誘発された血管(5、9)、神経(10)及びコラーゲン変化(11)の進展を軽減するという証拠によって支持される。バカラらは(12)最近、グリケーションされたアルブミンによるインビトロのNO<sup>+</sup>のクエンチがアミノグアニジン(アルブミンがグリケーション剤に接触したときに存在する)により軽減されることを報告し、グリケーション生成物が、NO<sup>+</sup>活性を軽減することにより内皮依存弛緩を損い得ることを提案した。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明によれば、温血哺乳動物において一酸化窒素の生成を阻害する新規な方法が提供される。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の方法は、少量である有効量のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物に投与して、一酸化窒素の生成を阻害することを含む。これらの化合物の薬学的に許容される塩、例えばHCl及び硫酸塩も哺乳動物に投与することができることが理解される。目下のところ、糖尿病合併症の病因は未だはっきりしておらず、それを予防し得ることが示された薬物療法は未だ存在しない。糖尿病合併症は、血糖濃度及びグリケートされたヘモグロビンにより影響されるので糖尿病の重症度に著しく関連するが、血糖濃度を通常にする努力により糖尿病合併症を防止及び/または逆転する試みの効果は、未だ報告されていない。

【0007】本出願人による1991年12月16日に出願された同時継続中の米国出願第07/807、912号には、動脈血圧を実質的に高めずに一酸化窒素の生成を阻害する量のアミノグアニジンを温血哺乳動物に投与することの特徴とする方法が開示されている。本発明によれば、通常のラットに静脈内注射した場合に動脈血圧が増加したことによって証明されたように、メチルグ

(3)

特開平6-9380

3

アニジンは構造性及びサイトカイン誘発されたNO生成の強力なインヒビターであることが発見された。しかしながら、アミノグアニジンとは対照的に、メチルグアニジンは高次のグリケーション最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の成長により証明されるグルコース誘発された高次グリケーション生成物を阻害することにおいて比較的非有効である。従って、糖尿病により誘発された血管機能不全のメチルグアニジンによる予防は、高次グリケーション最終生成物の生成よりもNO生成物を阻害する能力に帰することが明らかである。

【0008】本明細書は、本発明を形成すると考えられる主題を特に指摘し明確に権利を主張する特許請求の範囲で終結すると同時に、添付の図面に関連して説明される本発明の好適具体例の下記の説明によって、より明らかとなるであろう。図1は、メチルグアニジン(MG)、アミノグアニジン(AG)またはN<sup>6</sup>-モノメチル-L-アルギニン(NMMA)のボラス静脈内注射により誘発された平均動脈血圧(MAP)の変化を示すグラフであり、MAPの変化は、基底線より高い圧力の上昇により%で記録され、ボラス注射投与量は $\mu\text{mol/kg}$ で記録されている。図2は、Rin-m5F細胞によるIL-1 $\beta$ 誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン(MG)、アミノグアニジン(AG)またはN<sup>6</sup>-モノメチル-L-アルギニン(NMMA)の影響を示すグラフであり、亜硝酸塩生成に与える影響は、IL-1 $\beta$ 誘発された亜硝酸塩生成の%で記録され、試験化合物の濃度は $\mu\text{M}$ で記録されている。図3は、図2と同様に、Rin-m5F細胞によるIL-1 $\beta$ 誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン(MG)、ジメチルグアニジン(DMG)及びアミノグアニジン(AG)の影響を示すグラフである。図4は、グルコース-6-ホスフェート/リジン(G-6-P/リジン)中で6日間、メチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドをインキュベートした後の、蛍光性生成物の相対的な生成を示す棒グラフである。

【0009】構造性(血管の)一酸化窒素シンターゼの活性に与えるメチルグアニジンの影響は、麻酔状態の通常のラットにおけるメチルグアニジンの静脈内注射後の平均動脈血圧(MAP)の変化を監視することによって評価した。メチルグアニジン、アミノグアニジン及びNMMAの用量作用を図1に示す。メチルグアニジンは、L-アルギニン及び一酸化窒素シンターゼの拮抗インヒビター、即ちNMMAに強力な構造類似性を有している。これらの化合物は、2つの化学的に均等なグアニジド窒素基を有しており、Rin-m5F細胞による亜硝酸塩及びcGMPのIL-1 $\beta$ 誘発される生成に与えるメチルグアニジンの影響を調べて、同様の試験におけるNMMAの効果と比較した(図2)。また類似の試験において、メチルグアニジン及びその近接類似物ジメチルグアニジンをそれぞれアミノグアニジン(AG)の影

4

響と比較した(図3)。Rin-m5F細胞系は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームを含むことが示されている齧歯動物 $\beta$ 細胞のランゲルハンス島細胞群細胞系である。図2及び3は、5ユニット/mlのIL-1 $\beta$ と示された濃度のメチルグアニジン、ジメチルグアニジン、アミノグアニジン及びNMMAまたはAGとともに18時間インキュベートしたRin-m5F細胞による亜硝酸塩(一酸化窒素の酸化生成物)のIL-1 $\beta$ 誘発された生成物における、メチルグアニジン、ジメチルグアニジン、アミノグアニジン及びNMMAまたはAGの用量作用を示す。グリケーションに与えるメチルグアニジンの影響は、グルコース-6-ホスフェート/リジン中におけるインキュベート後の蛍光性生成物の成長を測定することによって評価され、アミノグアニジン及びセミカルバジドの相当する効果と比較した。結果を図4に示すが、グリケーションの最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の成長によって証明されるように、メチルグアニジンは、グルコース誘発されるグリケーション生成物の防止において比較的不活性である(アミノグアニジン及びセミカルバジドと比較して)ことを示している。

【0010】

【実施例】本発明をさらに説明するために、以下の詳細な実施例を開示するが、本発明は、これらの特定の実施例または本明細書中に記載される詳細部分によって限定されるものではないことを理解されたい。これらの実施例において得られた結果を表1〜5及び添付の図面1〜4中に示す。この実施例は、メチルグアニジンを使用して糖尿病により誘発される血管機能不全を予防して一酸化窒素シンターゼを阻害する方法を説明するものである。

【0011】材料及び方法

動物実験

これらの試験において使用した全てのラットを屋内に閉じ込め、「実験動物の愛護飼育に関する大学委員会」及び「実験動物福祉に関するNIHのガイドライン」に従って飼育した。ラットは別個に屋内に入れ、無制限に食糧(標準ラット用飼料:米国インディアナ州リッチモンドのラルストンビュリナ)及び水を与え、12時間明/暗周期の光を与えた。最初に225~250g重量であった雄のSprague-Dawleyラットを4つのグループに分けた:グループ1は、未処理の対照;グループ2は、メチルグアニジン(mg)処理した対照;グループ3は、未処理の糖尿病;及びグループ4は、mg処理した糖尿病。糖尿病は、ケタミン麻酔薬を使用してストレプトゾトシン(米国ミズーリ州セントルイスのシグマケミカル社製)を45mg/体重1kg静脈内注射することにより誘発した。メチルグアニジン塩酸塩(シグマケミカル社製)を25mg/体重1kgの投与量で1日1回皮下投与した。さらに、糖尿病のラットには1

(4)

特開平6-9380

5

g/Lのメチルグアニジンを含む水を与える一方、対照のラットには2.5 g/Lのメチルグアニジンを含む水を与えた。水の消費量は全てのラットに関して1週間毎に監視した。体重は1週間毎に測定し、非絶食の朝の血漿グルコース濃度をストレプトゾチン投与の3日後に評価して(糖尿病の誘発を確認し)、次いでその後2週間毎に、ローリーとバソノーの慣用グルコースオキシダーゼ方法(14)を使用して評価した。4週間後に、全てのラットを24時間個々の代謝ケージに入れ、食糧消費(g/体重100g/24時間)及び尿排出量(ml/腎臓/24時間)を測定した。尿の飼料を尿アルブミン排出量の測定のために-70℃で保存した(下記参照)。糖尿病誘発の5週間後に、ラットを使用して下記の浸透性及び血流の考察を行った。

#### 【0012】試験方法

部位血管アルブミン浸透を、2つの異なるヨウ素同位元素<sup>125</sup>I及び<sup>131</sup>Iにより標識したウシ血清アルブミン(BSA)の注射投与に基づく同位元素希釈技術を使用して定量化した(15~17)。<sup>125</sup>I-BSAを使用してトレーサー循環の10分後に血管アルブミン透過を定量化し、一方、<sup>131</sup>I-BSAは、血管内に含まれるトレーサーの<sup>125</sup>I-BSA組織活性の補正のための血漿容量マーカーとして作用した。

【0013】放射線標識されたトレーサーの調製  
精製されたモノマーBSA(20mg)を上記に記載のヨウ素同位元素方法(15)により<sup>125</sup>Iまたは<sup>131</sup>I(米国マサチューセッツ州ボストンのNENレーサープロダクツ製)1mCiによりヨウ化した。<sup>125</sup>I-EDTAを上記のようにして調製し(15、16)、<sup>45</sup>Sc-ミクロスフェア(10μm径)を使用して、下記の方法で部位血液流を評価した。

#### 【0014】外科的方法

ラットをイナクチン(FRG、コンスタンツ、バイカルデン)により麻酔し(〜100mg/体重1kg腹腔内投与)、熱灯、37℃の外科用トレー及び直腸温度探針を使用して、中心体温を37±0.5℃に維持した。左大腿部静脈、左腸骨動脈、右腸骨動脈及び右頸動脈に、ヘパリン処理した食塩水(400Uヘパリン/ml)が充填されたポリエチレン管(0.58mm内径)を挿入した。大腿部静脈カニューレを使用してトレーサーを注射投与し、右腸骨動脈カニューレを血圧の監視のための圧力変換器に接続した。左腸骨動脈を、0.055ml/分の一定速度で排出するために予め設けられたハーバードモデル940定速排出ポンプに取り付けられた1mlのシリンジに接続した。右頸動脈中のカニューレの先端を心臓の左心室中に置き、放射線標識されたミクロスフェアの注入に使用した。気管に挿管し、連続的の通気を助ける小動物用の人工呼吸装置に接続した。

#### 【0015】試験方法

時間0において、<sup>125</sup>I-アルブミン(食塩水0.3ml

6

1中)及び<sup>125</sup>Co-EDTA(食塩水0.1ml中〜0.1μCi)を静脈内注射し、排出ポンプを同時に始動した。時間0の8分後に、<sup>125</sup>I-BSA0.2mlを注射し、1分後に、<sup>45</sup>Sc-ミクロスフェアを〜30秒かけてゆっくりと注射した。10分後に、心臓の全血液流を停止させ、排出ポンプを同時に停止し、種々の組織をγ線分光測定のために採取した。腎臓、膀胱及び輸尿管を取り出した。目を上記に説明した方法により(15、16)切開し、両目から得られた組織をγ線分光測定の前に集めた。全ての組織試料及び動脈血漿試料の重量を計測し、ヒューレットパッカード1000Aコンピュータとインターフェースで接続されたγ線分光測定器により計測し、前記コンピュータによりデータがバックグラウンドに対して補正され、次の分析のために保存された。

#### 【0016】データの分析

<sup>125</sup>I-BSA組織溶解値の量的指標を既に説明した方法(15、16、17)で算出し、μg血漿/g組織重量/分として表現した。非常に簡単に、組織中の<sup>125</sup>I-BSA活性に、試験終了時に得られた動脈血漿試料中の<sup>125</sup>I-BSA/<sup>131</sup>I-BSA活性の比率をかけることによって、<sup>125</sup>I-BSA組織活性を、組織に含まれるトレーサーに関して補正した。血管一補正された<sup>125</sup>I-BSA組織活性を、時間平均化された<sup>125</sup>I-BSA血漿活性(排出シリンジから得られた血漿の十分に混合された試料から得られた)及びトレーサー循環時間(10分間)により割り、次いで組織重量1g当りに標準化した。腎糸球体の濾過速度(GFR)を既に説明した方法(18)により算出した。部位血液流を算出するために、網膜内の<sup>45</sup>Scの全活性を排出シリンジから得られた参照血液試料中の<sup>45</sup>Scの全活性で割り、次いで、ポンプ排出速度でかけ、ml/g組織重量/分として表現した(19)。

#### 【0017】高次グリコシル化最終生成物の調製

リジン-由来の高次グリコシル化生成物を、0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4中において、100mMのグルコース-6-リン酸塩及びL-リジンをインキュベートすることにより、バカラチの方法(12)で調製した。このインキュベートは、減菌状態を維持して行ない、暗所で室温において〜6日間維持され、その時に、パーキン-エルマーのLS-5B蛍光光度計を用い、370nmにおける励起及び440nmにおける放射を使用し、グリケーションの指標として相対的蛍光度を測定した。分光光度測定の前に、試料を食塩水で1:11に希釈した。10及び100mM濃度のメチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドがグリケーションプロセスを阻害する能力を2つの別個の試験において比較した(図4)。

#### 【0018】血圧測定

テイル-カフ方法(20、21)を使用して、意識のあ

(5)

特開平6-9380

7

るラットにおける収縮期の血圧を1週間の間隔において測定した。最初に、動物を拘束装置中に置き、血圧計を数回膨張させることによる方法を採用した。血圧は、浸透性の考察の間に麻酔状態のラットにおける腸骨動脈カニューレからも計測した。

【0019】平均動脈血圧に与えるメチルグアニジンの丸薬注射の影響

250から300g重量の通常の雄のSprague-Dawleyラットを、100mg/体重1kgのイナクチン、次いで0.1ml/体重1kgのd-ツボクラリン塩化物により麻酔し、左大腿部血管（トレーサー注入のため）及び右腸骨動脈（血圧の監視のため）にヘパリン処理された食塩水を充填したポリビニル管（0.8×0.5mm）を挿入し、気管にカニューレを挿入し、連続的通気を助けるために小齧歯動物用の人工呼吸装置に接続した。動脈血圧が安定した後、増加する量（3.1及び5.0μmol/kg体重）のメチルグアニジンまたはN<sup>ω</sup>-モノメチル-L-アルギニン（NMMA）を、別個の動物において0.5mlの容量で静脈内注射し、ピークの血圧上昇をゴウルのRS3200記録装置を使用して記録した。結果を基底線上の血圧上昇の百分率として表現した。

【0020】統計的分析

データは平均±1SDとして表現した。分散の分析は、SASの一般線形モデル手順を使用して行なった。多重比較に関連する潜在的なタイプ1の誤差を減少するために、各パラメーターに対するグループ間の全体の相違をバンデルベルゲンテストにより予め評価した。与えられたパラメーターに対するグループ間に、統計的に著しい相違（p<0.05）が認められた場合は、全てのデータの非母数（階級順）ブロン変換の後の最小二乗法により、二重方法の比較を行なった。

【0021】実施例2

本実施例は、Rin-m5F細胞によるIL-1β-誘発された亜硝酸塩生成における、メチルグアニジンの影響を説明するものである（図2）。ワシントン大学組織培養支援センターから入手したRin-m5F細胞を、トリプシン/EDTA処理により生長フラスコ（55〜80×10<sup>6</sup>細胞/フラスコ）から取り出し、1mlのベトリ血中に等分して入れた（1条件当り1〜2×10<sup>6</sup> Rin-m5F細胞）。細胞を、完全CMRL-1066組織培養基（10%熱不活性化された、ウシ胎児血清、2mML-グルタミン、50ユニット/mlヘニンリン及び50μg/mlストレプトマイシン）またはメ

8

チルグアニジン（MG）、アミノグアニジン（AG）若しくはNMMAを補給された完全CMRL-1066の1ml中において、18時間（95%空気及び5%CO<sub>2</sub>の雰囲気下で）インキュベートした。インキュベートの後、上清を除去し、亜硝酸塩を上記した方法（8、13）と同じ慣用方法により100μlアリコートにおいて測定した。結果をIL-1誘発された亜硝酸塩生成（%）として表わし、1試験当り3回の繰り返しを含む4の個々の試験の±SEMの平均値である。結果は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームによる一酸化窒素生成の阻害において、AG及びNMMAの両者は、MGよりも〜10倍大きいことを示している。

【0022】実施例3

Rin-m5F細胞によるIL-1β-誘発された亜硝酸塩の生成に与えるメチルグアニジン、1,1-ジメチルグアニジン及びアミノグアニジンのそれぞれの影響を、実施例2に記載の方法により試験し、得られた結果を図3に示す。結果は、亜硝酸塩シンターゼのサイトカイン誘発イソフォームの阻害については、AG>DMG>MGの順番で大きいことを示している。

【0023】下記の表1〜5及び添付の図面1〜4は、上記実施例において得られた結果を記録したものである。これらの結果は、メチルグアニジン及びジメチルグアニジンが、構造性及びサイトカイン誘発されたNO生成の強力なインヒビターであることを示している。このことは、図1に示されるように通常のラットに静脈内注射した場合のメチルグアニジンによる平均動脈血圧の上昇、並びに図2及び3に示されるようにメチルグアニジン及びジメチルグアニジンによる齧歯動物の細胞腔腺細胞における亜硝酸塩のIL-1β-誘発された増加の阻害により証明される。メチルグアニジンは、グルコース誘発されたグリケーション生成を妨げることに

（高次グリケーション最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の生成により証明される）、比較的不活性であるので（アミノグアニジンと比較して）（図4）、糖尿病誘発の血管機能不全のメチルグアニジンによる防止は、それがNO生成を阻害する能力に帰するものと考えられる。従って、メチルグアニジン及びその近接類似物であるジメチルグアニジンは、NOの生成の増加を伴う炎症性及び免疫性疾患の他、糖尿病の合併症の防止に有効である。

【表1】

(6)

特開平6-9380

9

10

表 1

体重、血漿グルコース及び水消費に与える  
糖尿病及びメチルゲアニジンの影響

|                    | 対 照    |        | 糖尿病     | 糖尿病<br>+mg |
|--------------------|--------|--------|---------|------------|
|                    | 対 照    | +mg    |         |            |
| ラット数               | 10     | 11     | 14      | 18         |
| 体 重 (g)            |        |        |         |            |
| 初 期                | 249±20 | 256±16 | 250±19  | 248±18     |
| 2週間後               | 326±25 | 300±31 | 297±23  | 271±23     |
| 4週間後               | 375±41 | 351±37 | 334±45  | 294±50     |
| 血漿グルコース<br>(mg/dL) | 130±15 | 131±28 | 419±120 | 420±87     |
| ヘマトクリット(%)         | 43±2   | 42±1   | 42±1    | 42±2       |
| 血 圧 (mm Hg)        |        |        |         |            |
| 意識あり               | 125±18 | 121±7  | 123±5   | 126±5      |
| 麻酔伏態               | 118±14 | 114±14 | 120±16  | 121±14     |
| 水消費 (ml/日)         | 46±6   | 32±9   | 108±42  | 93±53      |

【表2】

11

(7)

特開平6-9380

12

表 2

<sup>125</sup>I-アルブミン浸透\* に与える糖尿病  
及びメチルグアニジン(mg)の影響

|        | 対 照                 |          | 糖 尿 病                 |                     |
|--------|---------------------|----------|-----------------------|---------------------|
|        | 対 照                 | +mg      | 糖 尿 病                 | +mg                 |
| ラット数   | 10                  | 8        | 11                    | 9                   |
| 目      |                     |          |                       |                     |
| 前部ブドウ膜 | 266±77 <sup>a</sup> | 359±146  | 623±109 <sup>a</sup>  | 370±60 <sup>b</sup> |
| 後部ブドウ膜 | 328±106             | 312±101  | 742±134 <sup>a</sup>  | 358±108             |
| 網膜     | 47±12               | 61±11    | 116±30 <sup>a</sup>   | 55±18               |
| 座骨神経   | 47±13               | 47±10    | 121±22 <sup>a</sup>   | 50±10               |
| 大動脈    | 62±20               | 60±18    | 155±37 <sup>a</sup>   | 85±41               |
| 腎 臓    | 727±239             | 714±214  | 1011±265 <sup>c</sup> | 738±169             |
| 肺      | 1805±532            | 1656±454 | 1405±324              | 1498±487            |
| 横隔膜    | 201±75              | 190±27   | 210±61                | 216±46              |
| 心 臓    | 521±135             | 731±269  | 534±62                | 599±68              |
| 脳      | 5±3                 | 4±3      | 5±2                   | 6±4                 |

\*  $\mu\text{g}$  血漿/体重  $1\text{g}/\text{分}$ : 試験手順の詳細は実施例 I の方法を参照せよ。

<sup>b</sup> 平均±SD

スチューデントの t 検定により未処理の対照とは著しく異なる。

: <sup>a</sup>  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup>  $p < 0.01$ .

【表3】

40

13

(8)

特開平6-9380

14

表 3

部位血液流へ与える糖尿病及びメチルゲンジン(mg)の影響

|           |      | 前部ブドウ<br>(n) 膜 | 後部ブドウ<br>膜 | 網 膜         | 座骨神経        | 腎 臓       |
|-----------|------|----------------|------------|-------------|-------------|-----------|
| 対照        | (10) | 2.0±0.6        | 3.4±0.6    | 0.43±0.02   | 0.06±0.02   | 6.5±0.3   |
| 対照+mg     | (8)  | 2.4±0.5        | 3.3±0.6    | 0.45±0.07   | 0.07±0.03   | 4.8±0.3 * |
| 糖尿病       | (10) | 2.7±0.3 *      | 4.2±0.5 *  | 0.57±0.08 * | 0.09±0.01 * | 6.0±0.4 * |
| 糖尿病+mg(9) |      | 2.3±0.6        | 3.9±0.6    | 0.45±0.04   | 0.06±0.02   | 5.8±0.3 * |

\* ml/分/体重1g; 値は放射線標識されたミクロスフェアを使用して測定した  
平均±1SDである。(〜10μm 径)

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: \*p<0.001;

\*p<0.005; \*p<0.01.

【表4】

15

(9)

特開平6-9380

16

表 4

GFR\* へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

|        | (n)  | 全腎臓当り                      | 腎臓1g 当り     |
|--------|------|----------------------------|-------------|
| 対照     | (10) | 1.33 ± 0.19                | 0.85 ± 0.07 |
| 対照+mg  | (8)  | 1.53 ± 0.29                | 0.87 ± 0.08 |
| 糖尿病    | (10) | 1.81 ± 0.25 *              | 0.92 ± 0.14 |
| 糖尿病+mg | (8)  | 1.59 ± 0.15 <sup>b</sup> * | 0.85 ± 0.09 |

\* ml/分; 値は放射線標識された<sup>57</sup>Co-EDTAを使用して測定した平均±1SDである。

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: \*p<0.001;

<sup>b</sup>p<0.005

スチューデントのt検定により糖尿病と著しく異なる。: \*p<0.05.

【表5】



(10)

特開平6-9380

17

18

表 5

組織ソルビトールとミオイノシトールへ与える  
糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

|          | 対 照      |           | 糖尿病      |          |
|----------|----------|-----------|----------|----------|
|          | 対 照      | +mg       | 糖尿病      | +mg      |
| ラット数     | 7        | 8         | 11       | 9        |
| 網 膜      |          |           |          |          |
| ソルビトール   | 102±16*  | 102±31    | 983±275  | 533±265  |
| ミオイノシトール | 1613±516 | 1529±187  | 1564±452 | 1513±402 |
| 座骨神経     |          |           |          |          |
| ソルビトール   | 183±41   | 194±75    | 1999±334 | 1234±710 |
| ミオイノシトール | 3943±526 | 4263±1587 | 3444±639 | 3308±792 |
| 赤血球      |          |           |          |          |
| ソルビトール   | 6±1      | 6±2       | 44±9     | 40±8     |
| ミオイノシトール | 131±47   | 104±19    | 109±20   | 103±19   |

\* 値は平均±SDである。：試験手順については実施例1の方法を参照せよ。

【0024】本明細書中において説明した一酸化窒素生成のメチルグアニジン及びジメチルグアニジンインヒターは、慣用の方法、好ましくは薬学的に許容され得る希釈剤及び担体との処方物として温血哺乳動物へ投与されるように使用されることができる。投与される活性インヒターの量は、有効量、即ち、医薬的に効果的であるがその使用に伴う利益よりも重い毒性効果を示さない量でなければならない。人間の大人の一日当りの投与量は、通常、体重1キロ当たり薬品約1mg以上の範囲であると考えられる。投与の適当な経路は、カプセル、錠剤、シロップ、エレクトリシム及びその類似の形態による経口投与であるが、静脈内、腹腔内または皮下のような非経口投与を使用することもできる。生理食塩水のような水性溶液として本薬物を静脈内投与することを例としてあげることができる。治療投与形態物における薬学的に許容され得る希釈剤及び担体中の本薬物の適当な処方物は、例えば米国ペンシルベニア州イーストンのマックバプリッシングカンパニーのアーサー・オソル編集「レミントンズファーマシューティカルサイエンス」16版、(1980)のような本技術分野における一般的テキストを参考にして調製することができる。

【0025】当業者にとっては本明細書を読んだ後、本発明の精神と範囲を逸脱することのない種々のその他の実施例が明らかとなるであろう。そのような実施例の全

ては、本明細書中の特許請求の範囲の範囲内に包含されることを意図する。

【0026】本明細書中においてカッコ内に引用された参考文献は、下記の通りである。

1. D. J. スチュエール, H. J. チョ, N. S. ウォン, M. F. ウアイス, C. F. ナザン, 「*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*」, 88, 7773 (1991)。
2. S. モンカダ, R. M. J. バルマー, E. A. ヒグス, 「*Pharmacol. Reviews*」, 43, 109 (1991)。
3. J. ガースウェイト, 「*Trends Neurol. Sci.*」, 14:60 (1991)。
4. J. B. ヒブス, Jr., 6, 「*Nitric Oxide from L-Arginine: a Biological Regulatory System*」, S. モンカダ及びE. ヒグス, Eds. エルゼビエール, ニューヨーク, (1990), pp 189-223。
5. G. バグリーゼ, R. G. チルトン, J. R. ウィリアムソン, 「*Diabetes/Metabolism Reviews*」, 7, 35 (1991)。
6. C. サザン, D. シャルスター, I. C. グリーン, 「*Febs Lett.*」, 276, 42 (1990)。

(11)

特開平6-9380

19

7. J. A. コルベット, J. L. ウォン, M. A. スウィートランド, J. R. ランカスター, Jr., M. L. マクダニエル, 「Biochemical J.」 (submitted).
8. J. A. コルベット, J. R. ランカスター, Jr., M. A. スウィートランド, M. L. マクダニエル, 「J. Biol. Chem.」, **266**, 21351-21354 (1991).
9. J. R. ウィリアムソンら, 「Diabetes & Metab.」, **16**, 3369 (1990).
10. T. ソリス-リパロータ, M. クーパー, D. ババゾグロウ, B. クラーク, G. ジェラムス, 「Diabetes」, **40**, 1328 (1991).
11. M. キハラら, 「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, **88**, 6107 (1991).
12. M. ブラウンリー, A. セラミ, H. ブラッサラ, 「N. Engl. J. Med.」, **318**, 1315 (1988).
13. M. ブラウンリー, H. ブラッサラ, A. クーニー, P. ウルリッヒ, A. セラミ, 「Science」, **232**, 1629 (1986).
14. R. プカラ, K. J. トレーナー, A. セラミ, 「J. Clin. Invest.」, **87**, 432 (1991).
15. L. C. グリーンら, 「Anal. Biochem.」, **126**, 131 (1982).
16. O. H. ローリー, J. V. バソノー (1972) 「A Flexible System of Enzymatic Analysis」, オーランド: アカデミックプレス.
17. R. G. チルトン, K. チャン, G. バグリーゼ, D. M. イーフ, M. A. プロビンス, W. R. シャーマン, C. キロ, J. R. ウィリアムソン, 「Diabetes」, **38**, 1258-1270 (1989).
18. G. バグリーゼ, R. G. チルトン, A. スピーディー, K. チャン, M. A. プロビンス, C. キロ, J. R. ウィリアムソン, 「Metabolism」, **39**, 690-697 (1990).
19. G. バグリーゼ, R. G. チルトン, K. チャン, A. スピーディー, M. プロビンス, D. M. イー

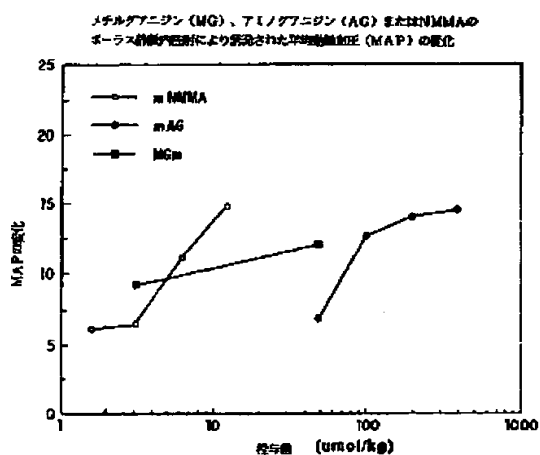
20

20. F. P. E. レイシー, C. キロ, J. R. ウィリアムソン, 「Diabetes」, **39**, 323-332 (1990).
  21. Y. Ido, R. G. チルトン, K. チャン, 及び J. R. ウィリアムソン, 「Kidney Int.」, In press, 1992.
  22. G. バグリーゼ, R. G. チルトン, A. スピーディー, E. サンタレリ, D. M. イーフ, M. A. プロビンス, C. キロ, W. R. シャーマン, J. R. ウィリアムソン, 「Diabetes」, **39**, 312-322 (1990).
  23. M. J. フレグリー, 「J. Lab. Clin. Med.」, **62**, 223-230 (1963).
  24. J. M. フェファー, M. A. フェファー, E. D. フローリッヒ, 「J. Lab. Clin. Med.」, **78**, 957-962 (1971).
- 【0027】政府の援助に対する謝辞  
この研究は、米国立保健研究所の認可DK06181, T32DK07296, EY06600, HL39934及びDK20579により一部援助を受けて行われた。
- 【図面の簡単な説明】  
【図1】メチルグアニジン (MG)、アミノグアニジン (AG) またはN<sup>6</sup>-モノメチル-L-アルギニン (NMMA) のボラス静脈内注射により誘発された平均動脈血圧 (MAP) の変化を示すグラフである。  
【図2】Rin-m5F細胞によるIL-1β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン (MG)、アミノグアニジン (AG) またはN<sup>6</sup>-モノメチル-L-アルギニン (NMMA) の影響を示すグラフである。  
【図3】図2と同様に、Rin-m5F細胞によるIL-1β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン (MG)、ジメチルグアニジン (DMG) 及びアミノグアニジン (AG) の影響を示すグラフである。  
【図4】グルコース-6-ホスフェート/リジン (G-6-P/リジン) 中で6日間、メチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドをインキュベートした後の、蛍光性生成物の相対的な生成を示す棒グラフである。

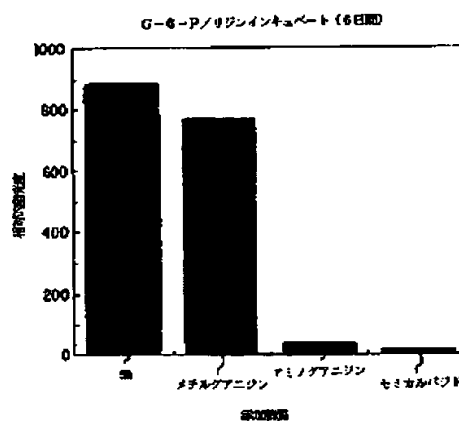
(12)

特開平6-9380

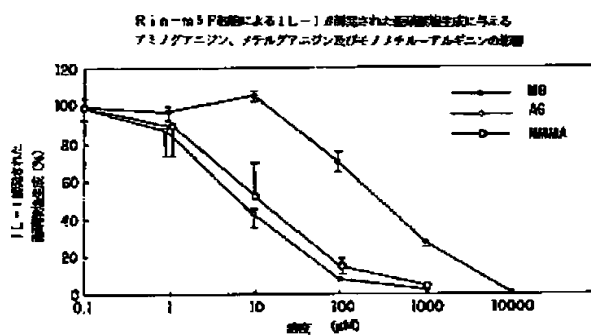
【図1】



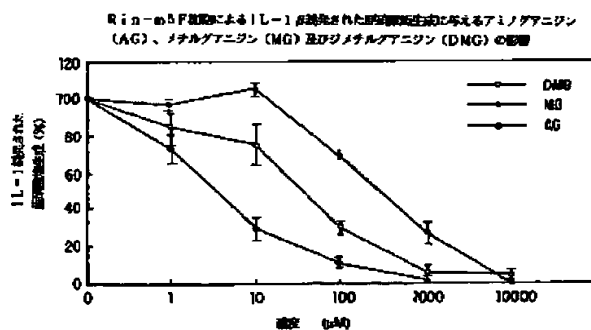
【図4】



【図2】



【図3】



(13)

特開平6-9380

フロントページの続き

(72)発明者 ジョン エイ. コーベット  
アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイ  
ス、エス. コークリッド 660. ワシント  
ン ユニバーシティ スクール オブ メ  
ド、デプト オブ パソロジィ 気付

(72)発明者 マイクル エル. マックダニエル  
アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイ  
ス、エス. コークリッド 660. ワシント  
ン ユニバーシティ スクール オブ メ  
ド、デプト オブ パソロジィ 気付

(72)発明者 ロナルド ジー. ティルトン  
アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイ  
ス、エス. コークリッド 660. ワシント  
ン ユニバーシティ スクール オブ メ  
ド、デプト オブ パソロジィ 気付

特開平6-9380

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第3部門第2区分  
 【発行日】平成12年11月21日(2000.11.21)

【公開番号】特開平6-9380  
 【公開日】平成6年1月18日(1994.1.18)  
 【年通号数】公開特許公報6-94  
 【出願番号】特願平5-38572  
 【国際特許分類第7版】

A61K 31/155 AED  
 ADP

【F1】

A61K 31/155 AED  
 ADP

【手続補正書】

【提出日】平成12年1月12日(2000.1.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一酸化窒素阻害有効量のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物(人間を除く)に投与することを含む該温血哺乳動物における一酸化窒素の生成を阻害する方法。

【請求項2】 前記メチルグアニジンまたはジメチルグ

アニジンが、前記哺乳動物へ静脈内または皮下に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記メチルグアニジンまたはジメチルグアニジンが、グルコース誘発された、高次グリケーション最終生成物の生成を実質的に妨げることなく一酸化窒素の生成を阻害する投与量により前記哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記メチルグアニジンが前記哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記ジメチルグアニジンが前記哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項6】 メチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを有効成分として含有する一酸化窒素生成阻害剤。